

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/80, C12P 25/00 C12N 1/14		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/00379 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Januar 1992 (09.01.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/01116 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 1991 (15.06.91)		(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).	
(30) Prioritätsdaten: P 40 20 181.3 25. Juni 1990 (25.06.90) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : KURTH, Roland [DE/DE]; Herderstrasse 29, D-6703 Limburgerhof (DE). PHILIPPSEN, Peter [DE/DE]; Hein-Heckroth-Strasse 26, D-6300 Giessen (DE). STEINER, Sabine [DE/DE]; Saarlandstrasse 14, D-6300 Giessen (DE). WRIGHT, Martin, C. [US/DE]; Martin-Luther-Strasse 13, D-7950 Biberach/Riss (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: NEW PROMOTER REGION

FUSION OF TEF PROMOTOR FRAGMENT AND TEF TERMINATION FRAGMENT

(54) Bezeichnung: NEUE PROMOTORREGION

Fusion aus TEF-Promotor- und TEF-Terminatorfragment

(57) Abstract

AAGCTTGCTCGTCCCCGCCGCGGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCC
HindIII

Described is the promoter region of the *A. gossypii* gene which codes the translation elongation factor EF-1 α . The promoter can be used in the synthesis of proteins.

CAGATAACCTCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCACGGGGCATGATGT

(57) Zusammenfassung

GACTGTGCCCCGTACATTTAGCCCATACTCCCCATGTATAATCATTGCA

Es wird die Promotorregion des *A.gossypii*-Gens, welches den Translationselongationsfaktor EF-1 α kodiert, beschrieben. Der Promotor lässt sich bei der Proteinsynthese einsetzen.

TCCATACATTTGATGGCCGCACGGCGGAAGCAAAATTACGGCTCCTC

GCTGAGACCTGCGAGCAGGAAACGCTCCCTCAGCAGACGGCTTGAAATT

ECORI

CCTCCCCACGGCGCGCCCCCTGTAGAGAAATAAAAAGGTTAGGATTGCCAC

TGAGGTTCTCTTCAATACATCTTTAAATCTTGCTAGGATACAGTT

Start

CTCACATCACATCCGAACATAAACAATAAGGTAAGGAAAGACTCACGT
HincII

Stop

TGACCTGGAGGTCCCCAAAAGGCTGSTAAGAAATAGAGTACTGACAA
XbaI

Scal

AAAAAGATTCTGTTTCAAGAACCTGTCAATTGTATAGTTTTTATAT

TGTAGTTGTTCTATTTAAATCAATGTTAGCGTGATTATATTTTTTG

CTCGACATCATGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGAAAGTAATCA

TGCGTCAATGTTGAAATGCTGGTCGTATACTGCTGTCATTGATAC

TAACGCCGCATCCAGTGTCT

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Neue Promotorregion**Beschreibung**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Promotorregion aus *Ashbya gossypii* (= *A.gossypii*), Pilze, die mit dieser Promotorregion genetisch verändert wurden, und deren Verwendung.

10 *A.gossypii* wird zur fermentativen Produktion von Vitamin B₂ eingesetzt. Es ist wünschenswert, die Anwendung der für *A.gossypii* vorhandenen Fermen-
tationstechnologie durch die Produktion von Proteinprodukten unter Verwen-
dung gentechnischer Methoden zu erweitern. Zu diesem Zweck wird ein
Expressionssystem für *A.gossypii* benötigt. Für einige höhere Ascomyceten
wie *Aspergillus niger* wurden solche Systeme bereits beschrieben (Rambosek
15 und Leach, CRC Critical Reviews in Biotechnology 6 (1987), 357-393). Da-
gegen liegen mit dem Hemiascomyceten *A.gossypii*, der einziger Vertreter
seiner Gattung ist, bisher keine Erfahrungen auf dem Gebiet der Gen-
technologie vor.

20 Essentieller Bestandteil eines Systems zur Expression von Genen, die für ein gewünschtes Produkt kodieren, ist die sogenannte Promotorregion, die

1) aus einem funktionellen Promotor, der für die Transkription des Gens unerlässlich ist, und

25

2) aus der 5'nicht-kodierenden Region (zwischen Promotor und Translationsstart), die nach Transkription in der mRNA für die Translation nötig ist,

30 besteht.

Gegenstand der Erfindung ist die Promotorregion des *A.gossypii*-TEF-Gens, welches den Translationselongationsfaktor EF-1 α (= TEF-1 α) kodiert.

35 Dieses Gen wird sehr stark exprimiert und besitzt daher eine sehr effiziente Promotorregion.

Die erfindungsgemäß erhaltene Promotorregion besitzt die im Sequenz-
protokoll Nr. 1 angegebene Nukleotidsequenz. Da man die funktionellen
40 Bereiche einer neuen und sequenzierten Promotorregion, die die Fähigkeit
zur Initiation der Transkription und Translation besitzen, am 3'-Ende gut
und am 5'-Ende weniger gut eingrenzen kann, ist nicht auszuschließen, daß
die natürliche Promotorregion des *A.gossypii*-Gens in der Länge leicht von
der angegebenen Sequenz abweicht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Terminatorregion des A. gossypii-TEF-Gens, welches den Translationelongationsfaktor EF-1 α (= TEF-1 α) kodiert.

5 Die Terminatorregion kann zur effizienten Transkriptionstermination verwendet werden.

Die erfindungsgemäß erhaltene Terminatorregion besitzt die im Sequenzprotokoll Nr. 2, Position 1513-2095, angegebene Nukleotidsequenz. Auch 10 3'-terminale Verkürzungen dieser Sequenz kommen als Transkriptions-terminator in Betracht.

Die Terminatorregion kann in Verbindung mit der TEF-Promotorregion oder mit anderen homologen oder heterologen Promotoren verwendet werden.

15

Gegenstand der Erfindung sind weiter Pilze, die die oben genannte Promotorregion oder Teile davon und/oder die oben genannte Terminatorregion oder Teile davon enthalten.

20 Die Promotorregion kann insbesondere in folgende Pilze insertiert werden: Ashbya gossypii, mit Ashbya eng verwandte Arten, wie insbesondere Eremothecium ashbyi und mit Ashbya nicht verwandte Gattungen wie insbesondere Aspergillus und Neurospora.

25 Die neue Promotorregion lässt sich herstellen

a) durch Clonierung des Gens für den Translationelongationsfaktor EF-1 α (TEF-Gen) aus A.gossypii einschließlich angrenzender DNA-Sequenzen und anschließende Spaltung,

30 b) durch Fusion von A.gossypii-DNA-Fragmenten an ein offenes Leseraster eines in A.gossypii selektierbaren Promotor-losen Gens, Isolierung stark exprimierender Transformanden und nachfolgende Selektion des TEF-Promotors,

35 c) durch chemische Synthese nach bekannten Methoden.

Die neue Promotorregion eröffnet die Möglichkeit, zusammen mit geeigneten Vektorsystemen, in A.gossypii und anderen Pilzen homologe und heterologe Proteine zur Überexpression zu bringen. Dabei kann es sich beispielsweise um konstitutiv verstärkte Expression von Genen der Vitamin B₂-Biosynthese, sowie Genen, die für die Überproduktion von Vitamin B₂ verantwortlich sind, handeln oder um die Überexpression und Isolierung von Proteinen, die wirtschaftlich von Bedeutung sind. Weiterhin kann mit Hilfe der neuen

Promotorregion das posttranskriptionale Modifizierungspotential (z.B. Glykosilierung) von *A.gossypii*, das unter Umständen von dem anderer Pilze verschieden ist, ausgenutzt werden. Da nicht alle heterologen Proteine in ausreichenden Mengen durch die bisher verwendeten Systeme wie *Aspergillus* 5 oder *Saccharomyces* hergestellt werden können, ist die Entwicklung von Expressionssystemen mit der effizienten TEF-Promotorregion für neue Wirtsorganismen (hier zum Beispiel *A.gossypii*) von großer Bedeutung.

Beispiele

10

1. Isolierung des *Ashbya gossypii*-TEF-Gens

Aus *A.gossypii*-Mycel isolierte DNA wurde mit den Restriktionsendo-nukleasen EcoRI und BamHI geschnitten. DNA-Fragmente, die das TEF-Gen oder Teile davon tragen, wurden nach Größentrennung der Restriktionsfragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese und eine nachfolgende Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten heterologen TEF-Genprobe identifiziert. Die TEF-Genprobe umfaßt die Nukleotide 363 bis 1235 des 1377 bp langen offenen Leserasters des *S. cerevisiae* TEF2-Gens (Schirmaier und Philippson, EMBO J. 3 (1984), 3311-3315). Ein 4,6 kb langes EcoRI-Fragment und ein 6,4 kb langes BamHI-Fragment hybridisierten mit der heterologen TEF-Genprobe. Fragmente dieser Längenbereiche wurden aus Agarosegelen eluiert, in den mit EcoRI bzw. BamHI geschnittenen Vektor pUC8 (Vieira und Messing, Gene 19 (1982), 259-268) kloniert und in *E.coli* transformiert. Die Klone mit TEF-DNA wurden durch Koloniehybridisierung (Grunstein und Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 3961-3965) mit Hilfe der ^{32}P -markierten heterologen Probe erkannt. Die positiven Klone enthielten entweder das 4,6 kb lange EcoRI-Fragment oder das 6,4 kb lange BamHI-Fragment. Beide Klone überlappen in einem Bereich von 2,1 kb, der die Homologie zur TEF-Genprobe trägt und der sequenziert wurde (Sequenz Nr. 2). Dieses 2,1 kb lange Fragment enthält das offene Leseraster von 1377 bp, 136 bp der 5'-nichtkodierenden Region und 582 bp der 3'-nichtkodierenden Region. Über die EcoRI-Schnittstelle hinaus wurden weitere 278 bp der 5'-nichtkodierenden Region bis zu einer HindIII-Schnittstelle bestimmt. Anschließend wurde die Promotorregion als 403 bp langes HindIII/HincII-Fragment, das neben den 379 bp vor dem Startcodon noch die ersten 24 bp des offenen Leserasters des TEF-Gens trägt, isoliert und für die Konstruktionen von pAG-100 und pAG-101 eingesetzt (Sequenz Nr. 1).

2. Plasmidkonstruktionen

- a) Der Vektor pAG-1 (Fig. 1) (hinterlegt DSM 6010), ein Derivat des Vektors pEX4 wurde gemäß Ernst und Chan, J.Bacteriol. 163 (1985), 5 hergestellt. pAG-1 enthält ein 1,7 kb SalI-Fragment mit dem für die Aminoglykosidphosphotransferase (APH(3')I) kodierenden Kanamycinresistenzgen des Transposons Tn903. Im ursprünglichen pEX4-Konstrukt wurde zunächst das 1695 bp PvuII-Fragment von Tn903 (Oka et al., J.Mol.Biol. 147 (1981), 217-226) in ein 10 Plasmid mit aufgefüllten SalI-Schnittstellen einligiert. Die SalI-Schnittstellen bleiben dabei erhalten und das Resistenzgen kann als 1,7 kb SalI Fragment isoliert werden. pAG-1 enthält die Saccharomyces cerevisiae ARS-Elemente ARS1 und 2 μ ARS und repliziert autonom in Ashbya gossypii.
- b) pAG-2 (Fig. 2). Das 1,7 kb SalI-Fragment mit den Kanamycin-resistenzgenen wurde aus pAG-1 ausgeschnitten und in die SalI Schnittstelle des S. cerevisiae E. coli Shuttlevektors XEp24 (Botstein et al., Gene 8 (1979), 17-24; New England Biolabs Inc., 20 Beverly, MA, USA, 1988-1989 Catalog, 112-113) eingefügt. Die Struktur des neu entstandenen Plasmides - pAG-2 - wurde durch Restriktionsendonukleasekartierung überprüft, wobei die im 1,7 kb SalI-Fragment gelegene XhoI-Schnittstelle zur Überprüfung der Insertorientierung benutzt wurde. pAG-2 enthält das Saccharomyces cerevisiae ARS-Element 2 μ ARS und repliziert autonom in Ashbya 25 gossypii.
- c) pAG-100 (Fig. 3). In die XhoI Schnittstelle von pAG-2, die 30 bp in 3'-Richtung hinter dem Translationsstart des Kanamycin-resistenzgens liegt, wurde nach Auffüllen der überstehenden Enden ein 403 bp langes HindIII/HincII-Fragment, das die Promotorregion und die ersten 24 bp des offenen Leserasters des Gens für den 30 Translationselongationsfaktor EF-1 α (TEF-Gen) aus A.gossypii enthält, eingefügt. Die Orientierung des Fragmentes in dem so entstandenen Plasmid pAG-100 wurde durch Restriktionsendonuklease-kartierung mit HindIII überprüft. Durch Einfügen des 403 bp langen Fragmentes wurden die 10 N-terminalen Aminosäuren der APH(3')I durch die ersten 8 Aminosäuren des A.gossypii Translationselongationsfaktors EF-1 α ersetzt. Entfernen oder Austausch 35 der ersten 19 Aminosäuren der APH(3')I durch andere Aminosäuren führt nicht zu einem Verlust der Aktivität (Chen und Fukuhara, Gene 69 (1988), 181-192). Die Sequenz des SalI-Fragmentes nach 40 Einfügen der TEF-Promotorregion zeigt Sequenz Nr. 2. pAG-100 enthält das Saccharomyces cerevisiae ARS-Element 2 μ ARS und repliziert autonom in Ashbya gossypii.

- d) pAG-5 (Fig. 4). Das 1,7 kb Fragment mit dem Kanamycinresistenzgen aus pAG-1 wurde in die SalI-Schnittstelle von pBR322 (Bolivar et al., Gene 2 (1977), 95-113) subkloniert. Das entstandene Plasmid - pJL3A - enthält im pBR322-Anteil jeweils eine BamHI- und eine EcoRI-Schnittstelle, so daß pJL3A durch Doppelverdau in ein 375 bp und ein 5688 bp Fragment zerlegt wird. Das große Fragment wurde mit einem 2,1 kb EcoRI/BamHI A.gossypii Fragment, das das offene Leseraster des Gens für den Translationselongationsfaktor EF-1 α (TEF-Gen) enthält (Sequenz Nr. 1), ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pAG-5 bezeichnet. pAG-5 enthält keine *Saccharomyces cerevisiae* ARS-Elemente.
- e) pAG-101 (Fig. 5). In die im offenen Leseraster des Kanamycinresistenzgens gelegene XbaI Schnittstelle wurde - wie für die Konstruktion von pAG-100 beschrieben - das 403 bp HindIII/HincII-Fragment mit der Promotorregion und den ersten 24 bp des offenen Leserasters des TEF-Gens aus A.gossypii eingefügt. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pAG-101. pAG-101 enthält keine *Saccharomyces cerevisiae* ARS-Elemente.
- f) pBKs1871 (Vorläuferplasmid für die TEF-Promotor-lacZ-Fusion): In die PstI Schnittstelle des Plasmides pBKs⁺ (Short et al., Nucleic Acid Res., 16 (1988), 7583-7600) wurde ein 3113 bp langes PstI Fragment aus dem Plasmid pMC1871 (Shapira et al., Gene, 25 (1983), 71-82) kloniert. Das Fragment trägt das offene Leseraster des lacZ-Gens aus *E.coli* (Kalnins et al., EMBO J., 2 (1983), 593-597), dem die ersten sieben Codons fehlen.
- g) pPL1 (Fig. 6). pBKs1871 wurde an der SmaI Schnittstelle vor dem lacZ-Gen linearisiert. In das linearisierte Plasmid wurde ein 1500 bp HincII-Fragment einkloniert, das den TEF-Promotor und angrenzende Sequenzen einschließlich der ersten acht Codons des TEF-Gens aus A.gossypii trägt. Dadurch entstand ein offenes Leseraster, das für eine β -Galactosidase codiert, deren erste sieben Aminosäuren durch die ersten acht Aminosäuren des EF-1 α aus A.gossypii ersetzt sind. Aus diesem Plasmid konnten TEF-Promotor-lacZ-Fusionen mit verschieden langen Bereichen des TEF-Promotors isoliert werden.
- h) pPL2 (Fig. 9). pBKs1871 wurde an der SmaI-Schnittstelle vor dem lacZ-Gen linearisiert. In das linearisierte Plasmid wurde ein 294 bp langes RsaI/HincII-Fragment einkloniert, das Teile des TEF-Promotors (270 bp) sowie die ersten acht Codons des TEF-Gens aus A. gossypii enthält (24 bp).

- 5 i) pPL3 (Fig. 10). pBKS1871 wurde an der SmaI-Schnittstelle vor dem lacZ-Gen linearisiert. In das linearisierte Plasmid wurde ein 239 bp langes HaeIII/HincII-Fragment einkloniert, das die ersten acht Codons des TEF-Gens (24 bp) und 215 bp der in 5'-Richtung vor dem Startcodon gelegene Bereiche der nichttranslatierten Region enthält.
- 10 j) pPL4 (Fig. 11). pBKS1871 wurde an der SmaI-Schnittstelle vor dem lacZ-Gen linearisiert. In das linearisierte Plasmid wurde ein 158 bp langes EcoRI/HincII-Fragment einkloniert, das die ersten acht Codons des TEF-Gens und 134 bp der in 5'-Richtung vor dem Startcodon gelegenen Bereiche der nichttranslatierten Region enthält.
- 15 k) pAG-110 (Fig. 7). Durch Spaltung von pPL1 mit XbaI und SalI wurde ein 4600 bp Fragment, das die Fusion des 1500 bp langen TEF-Promotorfragmentes mit dem lacZ Gen trägt, isoliert. Dieses Fragment wurde nach Auffüllen der überstehenden Enden in die aufgefüllte BamHI Schnittstelle von pAG-100 einkloniert.
- 20 l) pAG-111 (Fig. 8). Durch Spaltung von pPL1 mit HindIII wurde ein 3509 bp langes Fragment isoliert. In diesem Fragment ist die TEF-Promotorregion um 1100 bp verkürzt. Sie entspricht damit der Promotorregion, die in pAG-100, pAG-101, pAG-110 und pAG-111 die Transkription des G418 Resistenzgens kontrolliert. Nach Auffüllen der überstehenden Enden wurde das 3509 bp lange Fragment in die aufgefüllte BamHI Schnittstelle von pAG-100 einkloniert.
- 25 m) pAG-112 (Fig. 12). Nach Spaltung von pPL2 mit XbaI und SalI wurde ein 3392 bp langes Fragment, das die Fusion des 294 bp langen Promotorfragmentes mit dem lacZ-Gen trägt, isoliert und nach Auffüllen der überstehenden Enden in die aufgefüllte BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAG-100 eingesetzt.
- 30 n) pAG-113 (Fig. 13). Nach Spaltung von pPL3 mit XbaI und SalI wurde ein 3337 bp langes Fragment, das die Fusion des 239 bp langen Promotorfragmentes mit dem lacZ-Gen trägt, isoliert und nach Auffüllen der überstehenden Enden in die aufgefüllte BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAG-100 eingesetzt.

- o) pAG-114 (Fig. 14). Nach Spaltung von pPL4 mit HindIII wurde ein 3273 bp langes Fragment, das die Fusion des 158 bp langen Promotorfragmentes mit dem lacZ-Gen trägt, isoliert und nach Auffüllen der überstehenden Enden in die aufgefüllte BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAG-100 eingesetzt.
- 5
- p) pAG-115 (Fig. 15). Nach Spaltung von pBKS 1871 mit BamHI wurde ein 3069 bp langes Fragment isoliert, das das offene Leseraster des lacZ-Gens trägt, wobei die ersten sieben Codons des offenen Leserasters fehlen und kein Promotorfragment vor das offene Leseraster fusioniert wurde. Dieses Fragment wurde in die BamHI-Schnittstelle des Plasmides pAG-100 eingefügt.
- 10
- q) pAG-120.pBIK^{S-} (Short et al., Nucleic Acid Res. 16 (1988), 7583-7600) wurde mit SspI und ScaI gespalten und ein 2084 bp langes Fragment isoliert. YEP24 (Botstein et al., Gene 8 (1979), 17-24) wurde mit ScaI und ClaI gespalten und ein 2782 bp großes Fragment isoliert. Dieses wurde nach Auffüllen der überstehenden Enden mit dem 2084 bp langen ScaI/SspI-Fragment aus pBIK^{S-} ligiert, so daß wieder ein vollständiges Ampicillinresistenzgen entstand (ScaI schneidet in pBIK^{S-} und YEP24 im Ampicillinresistenzgen).
- 15
- r) pAG-121.pAG-100 wurde mit SalI und HindIII geschnitten und ein 669 bp langes Fragment, das einen Teil des G418-Resistenzgens trägt, isoliert. Dieses wurde in das SalI/HindIII geschnittene Plasmid pBIK^{S+} (Short et al., Nucleic Acid Res. 16 (1988), 7583-7600) einkloniert.
- 20
- s) pAG-122.pAG-100 wurde mit HindIII geschnitten und ein 940 bp langes Fragment, das einen Teil des G418-Resistenzgens unter Kontrolle des TEF-Promotors trägt. Dieses wurde in das mit HindIII geschnittene Plasmid pAG-121 so eingefügt, daß ein vollständiges G418-Resistenzgen entstand. Transformation dieses Plasmides in E. coli erlaubt eine Transformandenselektion auf Kanamycin-haltigem Medium.
- 25
- t) pAG-123.pAG-122 wurde mit SalI und BamHI geschnitten und ein 1639 bp langes Fragment isoliert, das das G418-Resistenzgen unter Kontrolle des TEF-Promotors trägt. Dieses wurde in das mit ScaI geschnittene Plasmid pAG-120 eingefügt, wodurch eine Selektion von E. coli Transformanden auf Kanamycin-haltigem Medium ermöglicht wurde.
- 30
- 35
- 40

u) pAG-130.pBIKS⁺ (Short et al., Nucleic Acid Res. 16 (1988), 7583-7600) wurde mit HindIII und HincII gespalten und das 403 bp lange HindIII/HincII-TEF-Promotorfragment eingefügt.

5 v) pAG-131. Aus dem Clon, der das 2,1 kb große Fragment genomischer A. gossypii DNA trägt, auf dem das TEF-Gen enthalten ist, wurde ein 260 bp großes HaeIII/AccI-Fragment isoliert, das 25 Nukleotid des 3'-Endes des TEF-Gens sowie in 3'-Richtung daran anschließende Bereiche enthält (Terminatorfragment). Dieses Fragment wurde nach Auffüllen der überstehenden Enden in das mit HincII gespaltene Plasmid pBIKS⁻ (Short et al., Nucleic Acid Res. 16 (1988), 7583-7600) eingefügt.

10 w) 15 pAG-132. pag-130 wurde mit ScaI und XhoI geschnitten und ein 2248 bp großes Fragment isoliert. pAG-131 wurde ebenfalls mit ScaI und XhoI gespalten und ein 1442 bp großes Fragment isoliert, das so mit dem 2248 bp Fragment aus pAG-103 ligiert wurde, daß erneut ein vollständiges Ampicillinresistenzgen entstand.

20 x) M13PT. pAG-132 wurde mit BamHI gespalten und ein 752 bp großes Fragment isoliert, das die Fusion aus TEF-Promotor- und TEF-Terminatorfragment enthält. Dieses wurde in die BamHI-Schnittstelle von M13mp9 einkloniert.

25 y) M13PT1, M13PT2, M13PT3.
M13PT wurde durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (Kramer et al., Nucl. Acid Res. 24 (1984), 9441-9556) so verändert, daß hinter dem Stopcodon des TEF-Gens (im Terminatorfragment) eine ScaI-Schnittstelle und im Startcodon des TEF-Gens (im Promotorfragment) eine NcoI-Schnittstelle (M13PT1), eine NsiI-Schnittstelle (M13PT2) oder eine SphI-Schnittstelle (M13PT3) hergestellt wurde (Fig. 17).

30 z) 35 pAG-201. pAG-202 pAG-203 (Fig. 18)
M13PT1, M13PT2 und M13PT3 wurden mit BamHI gespalten und aus der Spaltung wurde das 751 bp große Fragment mit Promotor- und Terminatorregion des TEF-Gens isoliert. Dieses TEF-Signalsequenz wurde in die BamHI-Schnittstelle des Plasmides pAG-123 eingefügt und ergab das Plasmid pAG-201. Nach dem gleichen Verfahren wurden 40 aus M13PT2 das Plasmid pAG-202 und aus M13PT3 das Plasmid pAG-203 konstruiert.

3. Transformation von *A.gossypii* mit TEF-Promotorregion-Plasmiden

Die Transformationen erfolgten nach folgendem Schema:

- 5 - 200 ml MA2 mit ca. 1-2x10⁷ Sporen beimpfen
- 32-40 h bei 27°C mit 350 Upm in Schikanenkolben inkubieren
- Myzel mit Saugfiltration abfiltrieren und 1x in 30 ml H₂O waschen
- 10 - Frischgewicht bestimmen (ca. 2-3 g)
- Myzel in 30 ml SD suspendieren und 30 min bei 30°C in Schüttler inkubieren
- 15 - Myzel in 5-10 ml SPEZ pro g Frischgewicht suspendieren
- Bei 30°C in Wasserbadschüttler inkubieren, Protoplastierung mikroskopisch überprüfen (nach 30 min sollte ein Protoplastierungsgrad von über 90 % erreicht sein)
- 20 - Protoplastensuspension über Glasfilter (Schott, Porosität 1) filtrieren
- 25 - Filtrat 5 min zentrifugieren (Sorvall SM24 Rotor, 1800 Upm)
- Sediment 1x in 20 ml ST und 1x in 20 ml STC waschen
- Protoplasten in 20 ml STC suspendieren und Titer in Zählkammer bestimmen
- 30 - Nach Zentrifugation Protoplasten zu einer Dichte von 4x10⁸/ml in STC resuspendieren
- 35 - 100 µl Protoplastensuspension zu DNA in maximal 15 µl TE geben und mischen (DNA-Mengen: für replizierende TEF-Promotorregion-Plasmide: 1-10 µg; für integrative Transformation mit linearisierten TEF-Promotorregion-Plasmiden: 15-20 µg)
- 40 - 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Vorsichtig 1 ml PTC40 zugeben und durch Invertieren mischen

- 5 min zentrifugieren (Heraeus Biofuge A, 1500 Upm)
 - Überstand vorsichtig abziehen und Sediment in 1 ml SMTCI suspendieren
- 5
- 3 h bei 27°C inkubieren, ca. alle 45 min durch Invertieren mischen
 - Nach Zentrifugation Sedimente in 1 ml SM suspendieren
- 10
- Suspension mit 9 ml SMA2 Toplayer mischen und auf SMA2 Platte geben (20 ml SMA2-Agar pro Platte)
 - Platten 18 h bei 27°C inkubieren
- 15
- Platten mit G418 überschichten (0,54 ml G418 Stammlösung + 0,46 ml H₂O + 6 ml 0,5 % Agarose (in H₂O, vorgewärmt auf 42°C))
 - Platten bei 27°C weiter inkubieren, Transformanden sind bei replizierenden Plasmiden nach 2-3 Tagen, bei Integration nach 3-6 Tagen sichtbar
- 20

Medien und Lösungen

25	Medien:	MA2: Pepton (Gibco Caseinhydrolysat, No. 140): 10 g/l
		Hefeextrakt (Gibco) : 1 g/l
		Glucose 10 g/l
		myo-Inositol 0,3 g/l
30	SMA2-Agar:	Sorbitol : 1 M
		Pepton : 10 g/l
		Hefeextrakt : 1 g/l
		Glucose 20 g/l
		myo-Inositol 0,3 g/l
35		Agar (Gibco) 12 g/l

SMA2-Toplayer: Wie SMA2-Agar, statt Agar 0,8 % Agarose

Lösungen: SD: 1M Sorbitol; 50 mM Dithiothreitol

SPEZ: 1M Sorbitol; 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 5,8;
5 10 mM EDTA; 2 mg/ml Zymolyase 20 T (Seikagaku Kogyo
Co., Tokyo)

ST: 1M Sorbitol; 10 mM Tris-Cl pH 8

10 STC: 1M Sorbitol; 10 mM Tris-Cl pH 8; 10 mM CaCl₂

TE: 10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA

15 PTC40: 40 % (w/v) Polyethyenglykol 4000 (Merck);
10 mM Tris-Cl pH 8; 10 mM CaCl₂

SMTCI: 50 % SM (siehe unten); 50 % STC; 0,03 g/l
myo-Inositol

20 SM: 50 % 2M Sorbitol; 50 % MA2

G418-Stammlösung: 20 mg/ml G418 (Geneticin, Gibco) in H₂O

4. Transformationsergebnisse mit TEF-Promotorregionplasmiden

25 Die Ergebnisse von verschiedenen Tranformationen, die nach Beispiel 3
durchgeführt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Bei allen
Experimenten wurden Transformanden mit einer G418-Konzentration von
0,3 mg/ml pro Transformationsplatte selektiert. Bei dieser
G418-Konzentration wird das Wachstum von A.gossypii Myzel vollständig
30 inhibiert. Bei Transformation mit den rekombinanten DNA-Vektoren pAG-1
und pAG-2, bei denen das G418-Resistenzgen unter Kontrolle des ur-
sprünglichen bakteriellen Promotors und nicht unter Kontrolle der TEF
Promotorregion steht, entstanden bei dieser Konzentration keine Trans-
formanden. Um mit diesen rekombinanten DNA Vektoren Transformanden zu
35 erhalten, darf die G418-Konzentration 0,1 mg/ml pro Transformations-
platte nicht überschreiten. Bei dieser Konzentration sind bis zu 80 %
der auftretenden Kolonien keine Transformanden.

Tabelle 1: Transformationsergebnisse

Experiment	Plasmid	DNA pro Transf., µg	Transformanden pro µg DNA	Transformanden pro lebensfäh. Protoplasten
5	1 pAG-1	10	0	0
	1 pAG-2	10	0	0
	1 pAG-100	10	10	$1,2 \times 10^{-4}$
10	2 pAG-100	0,1	10	$1,6 \times 10^{-5}$
	3 pAG-100	1	3	$3,4 \times 10^{-4}$
	3 pAG-101, mit BamHI linearisiert	20	0,05	$1,1 \times 10^{-5}$

15

5. Transformationsergebnisse mit lacZ-Plasmiden

Um die Funktionsfähigkeit des TEF-Promotors weiter zu untersuchen, wurden Derivate des Plasmides pAG-100 konstruiert, in denen das Gen für die β-Galactosidase aus E.coli (lacZ-Gen) unter Kontrolle des TEF-Promotors steht. Hierfür wurden verschiedene Bereiche der Promotorregion des TEF-Gens vor das offene Leseraster des lacZ-Gens fusioniert, wobei die ersten sieben Codons des lacZ-Gens durch die ersten acht Codons des TEF-Gens ersetzt wurden. Das Plasmid pAG-110 trägt ein ca. 1,5 kb langes HincII TEF-Promotorfragment vor dem lacZ-Gen und das Plasmid pAG-111 das 403 bp lange HindIII/HincII-TEF-Promotorfragment, das bereits für die Konstruktionen von pAG-100 und pAG-101 eingesetzt wurde. Das Plasmid pAG-112 trägt ein 294 bp langes TEF-Promotorfragment, Plasmid pAG-113 ein 239 bp langes TEF-Promotorfragment und pAG-114 ein 158 bp langes TEF-Promotorfragment.

Zusätzlich wurde als Kontrollplasmid pAG-115 konstruiert, das das offene Leseraster des lacZ-Gens ohne Fusion an ein Promotorfragment trägt.

Nach Transformation dieser Plasmide in A.gossypii wurde die Expression des lacZ-Gens mittels eines Farbtests überprüft. Die vom lacZ-Gen codierte β-Galactosidase spaltet X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactosid) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo. pAG-110-, pAG-111- und pAG-112-Transformanden bildeten auf Medium, das X-Gal (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York 1972, 48) in einer Konzentration von 100µg/ml enthielt, blaue Kolonien. Bei Transformanden, die pAG-113, pAG-114 oder pAG-115 enthielten, war keine Blaufärbung zu sehen.

Einen Überblick über die verschiedenen TEF-Promotorfragmente, die vor das lacZ-Gen fusioniert wurden, zeigt Fig. 16. Ein + steht für eine Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigem Medium, ein - für keine sichtbare Blaufärbung.

5

Für eine weitere Untersuchung der β -Galactosidase-Expression wurde die β -Galactosidaseaktivität aus Flüssigkulturen von pAG-110-, pAG-111-, pAG-112-, pAG-113-, pAG-114- und pAG-115-Transformanden bestimmt. Hierfür wurde das Mycel mit Glaskugeln aufgebrochen (Rose, M.; Casadaban, M.J. and

10 Botstein, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 4 (1981), 2460-2464). 0,5 g Mycel, das in MA2-Flüssigmedium mit 200 μ g/ml G 418 gewachsen war, wurden in 0,1 mM Tris, pH 8,0/20 % (vol/vol) Glycerin/1 mM DTT/1 mM PMSF aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 g Glaskugeln (Durchmesser 0,45-0,5 mm) bei -20°C weggefroren. Für den Aufschluß des Mycels 15 wurde 12 mal 15 sec bei 4°C heftig geschüttelt (Vortex). Anschließend wurde zweimal für 20 min bei 10000 rpm zentrifugiert (Sorvall Kühlzentrifuge). Die Überstände wurden 1:10 bzw. 1:20 in Z-Puffer (0,06 M Na₂HPO₄/0,04 M NaH₂PO₄/0,01 M KCl/0,001 M MgSO₄/0,05 M β -Mercaptoethanol) verdünnt. In den verdünnten Protein-Rohextrakten wurde die β -Galactosidase- 20 aktivität durch Spaltung von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid bestimmt (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York 1972, 353ff). Die Enzymaktivität wurde in Relation zu der Proteinkonzentration im Rohextrakt gesetzt, die mittels der Methode von Bradford bestimmt wurde (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254). Die 25 Ergebnisse der β -Galactosidase-Aktivitätsbestimmung zeigt Tabelle 2. Angegeben ist die pro Minute und mg total Protein freigesetzte Menge an o-Nitrophenol (gemessen als OD₄₂₀).

Tabelle 2: β -Galactosidase-Expression

30

Plasmid	Messung Nr.	β -Galactosidaseaktivität (relative Einheiten, OD ₄₂₀ /mg min)
pAG-110	1	3,62
	2	3,54
	3	2,45
pAG-111	1	3,07
	2	3,29
	3	3,63
	4	3,16
pAG-112	1	1,89
	2	1,90
	3	1,79
	4	1,75

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Plasmid	Messung Nr.	β -Galactosidaseaktivität (relative Einheiten, OD ₄₂₀ /mg min)
5 pAG-113	1	0
	2	0
pAG-114	1	0
	2	0
pAG-115	1	0
	2	0
10		

Sequenzprotokolle

Nr.1:

15

Art der Sequenz : Nucleotid

Sequenzlänge : 409 Basenpaare

Strangform : Einzelstrang

Topologie : linear

20 Art des Moleküls: Genom-DNA

Herkunft : A.gossypii

Eigenschaften : Promotorregion

25 AAGCTTGCT CGTCCNCGC GGGTCACCCG GCCAGCGACA TGGAGGCCA GATACCCTCC 60
 TTGACAGTCT TGACGTGCGC AGCTCACGGG GCATGATGTG ACTGTCGCC GTACATTAG 120
 CCCATACATC CCCATGTATA ATCATTGCA TCCATACATT TTGATGGCCG CGACGGCGCG 180
 30 AAGCAAAAT TACGGCTCCT CGCTGCAGAC CTGCGAGCAG GGAAACGCTC CCCTCAGCAG 240
 ACGCGTTGAA TTCTCCCCAC GGCGCGCCCG TGTAGAGAAA TATAAAAGGT TAGGATTGTC 300
 35 CACTGAGGTT CTTCTTCAT ATACTTCCTT TAAAAATCTT GCTAGGATAC AGTTCTCACA 360
 TCACATCCGA ACATAAACAA AAATGGGTAA GGAAAAGACT CACGTTAAC 409

40

Nr. 2

Sequenz des 2,1 kb EcoRI/BamHI Fragmentes mit dem offenen
Leseraster des TEF Gens

10	20	30	40	50	60
5' GAATTCCTCC	CACGGGGGGC	CCCTGTAGAG	AAATATAAAA	GGTTAGGATT	TGOCACRGAG
70	80	90	100	110	120
GTTCCTTCTT	CATATACCTC	CTTTAAMAT	CTTGCTAGGA	TACAGTTCTC	ACATCACAC
130	140	150	160	170	180
CGAACATAAA	CAAAAATGGG	TAAGGAAAAAG	ACTCACGTTA	ACGGTGTGGT	CATGGTCAAC
190	200	210	220	230	240
GTCGACTCTG	GTAAAGTCTAC	TACCAACCGGT	CACTTGATCT	ACAAGTGTGG	TGGTATTGAC
250	260	270	280	290	300
AAGAGAAACCA	TCGAGAAAGTT	CGAGAAGGGAG	GCTGCCGAGT	TCGGTAAGGG	TTCCTTCAAG
310	320	330	340	350	360
TACGCCCTGG	TTTTGGACAA	ATTGAAGGCT	GAGGAGAGAGA	GAGGTATCAC	CATGGACATT
370	380	390	400	410	420
CCGTTGTGGA	ACTTCGAGAC	TOCAAAGTAC	CACTCTCTG	TCATTGACCC	CCAGGOCAC
430	440	450	460	470	480
AGAGACTCTA	TCAAGAACAT	GATTACCGGT	ACTTCCTCAAG	CTGACTGTGC	CATCTTGATC
490	500	510	520	530	540
ATTGCTGGTG	GTGTCGGTGA	GTTCGAGGCT	GGTATCCTCCA	AGGACGGTCA	GACCGAGAG
550	560	570	580	590	600
CACGCTTGT	TGGCTTACAC	CTTGGCTCTC	AAAGCAGTTGA	TGTTTGCCAT	CAACAAAGATG
610	620	630	640	650	660
GACTCCCTCA	AGTGGGACGA	GTCCAGATAC	CAGGAGATTC	TCAAGGAGAC	CTCCAACTTC
670	680	690	700	710	720
ATCAAGAAGG	TCGGTTACAA	CCCTAAGACT	GTTCCTATCG	TTCCAACTTC	CGGCTGGAAC
730	740	750	760	770	780
GGTGACMACA	TGATTGAGGC	CACCIACMAC	GGCCCATGGT	ACAAGGGCTG	GGAGAAGGAG
790	800	810	820	830	840
ACCAAGGCTC	GTGCGCTCIA	GGGTAAAGACC	TTGTTGGAGG	CCATTGACCC	CAATTGAGCCA
850	860	870	880	890	900
CCTGTCAGAC	CACTCTCAA	GGCATTCAGA	TTGCCATTCC	AGGAGTACIA	CAAGATCGGT
910	920	930	940	950	960
GGTATTGCTA	CGGTTCCTAGT	CGCCAGAGTC	GAGACCGGTG	TCACTCAAGCC	AGGTATGGT
970	980	990	1000	1010	1020
GTAACTCTG	CCCCATCCGG	TTCACCACT	GAAGTCAGT	CGTTCAGAT	CGACCAAG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CAATTGGGAG	AGGGTGTCCC	AGGTGACMAC	GTGCGTTCA	ACGTCAAGAA	CGTCCTCGTC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AAGGAGATCA	GAAGAGGAA	CTTTCGGGT	GAACCCAGA	AGGACCCACC	AAAGGCTGCT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GACTCCCTCA	ACGGTACCGT	CATTGCTTG	AACCACCCAG	GTCAAACTTC	TGCGCGTTAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TCTCCAGCT	TGGACTCTCA	CACTGCCAAC	ATTGCTTGA	AGTTGGACGA	CTTGTGGAG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAGAACGACA	GAAGAACGGG	TAAGMAATTG	GAAGACTCTC	CAAGTTCC	AAAGGCGGT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GAACCTGCGA	TGGTCAAGTT	TGTCCTATCC	AGGCCATGT	GTCTTGAGGC	TTTCACCGAC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TACCCACCAT	TGGTGTAGATT	CGCTCTCAGA	GAATGAGAC	AGACCGTTGC	TGTCGGTGTG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ATCAAGTCTG	TTGTCAAGTC	CGACGAGGT	GGTAAAGTC	CCAAGGCCCC	CCAAAGGGCT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GCTAAGAAAT	AGAGTAACTG	ACAAATAAAA	GATTCTGT	TTCAAGAACT	TGTCATTCT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
ATAGTTTTT	TTATTTGAG	TTCTCTTATT	TTATCAAT	GTAGGGTGA	TTTATTTT

Nr. 2 (Fortsetzung)

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TTTGTGCTCG ACATCATCIG CCCAGATGCG AAGTTAAGTG CGCAGAAAGT AATATCAAGC
1690 1700 1710 1720 1730 1740
GTCGAATCGTA TGTGAATGCT GGTGCCTATA CTCCTGTCGA TTGGAACTCA AGGGCGCCAT
1750 1760 1770 1780 1790 1800
CCAGCTGCTCA CCTGTCAAAAT TTGCCAGCGT CAAATGCTTC CAGGATAGAA TATGCTGAC
1810 1820 1830 1840 1850 1860
AACTGTTGAA GTCATCAAC AAGGATAACC CATATGCTCT ATGGGGGAG AAAACGTTGC
1870 1880 1890 1900 1910 1920
CAGAGCGCT TCTTCCGCA GACGTGCCCC TTCCACTGCT AGATGAGAAG TACGGGGTAG
1930 1940 1950 1960 1970 1980
TTAGTCTTC CAGGCGCTGT AAATGCGCA ATAAATGCTT CCTGGGGTC GCTACCCAT
1990 2000 2010 2020 2030 2040
CTCAGCCAGA CGAGTTCTA CAAACCTCA AGGACCGCTT TTTCATATAT GGCCACCCAGG
2050 2060 2070 2080 2090
TCAATATAGA GCGAGCGAAC GATGATCCAT TCTGGTATAT TGAACGGGAG GATCC 3'

Nr. 3

Sequenz der Kanamycinresistenzgen - TEF Promotorregion - Fusion
(TEF Promotorregion Sequenzen unterstrichen)

10	20	30	40	50	60
5' GTCGACTGTAA	ATCCCGGCAG	CGCAACGGAA	CATTCACTAG	TGTAAAAATG	GAATCAATAA
70	80	90	100	110	120
AGCCCTGGCC	AGCCCGCAGG	GTCAGCCGTGA	ATACGGCTT	AATGACCAGC	ACAGTCGTGA
130	140	150	160	170	180
TGGCAAGTC	AGAATAGGCC	TGAGGTCTGC	CCTCGTGAAGA	AGGTGTTGCT	GACTCATACC
190	200	210	220	230	240
AGGCCGTAA	CGCCOCATCA	TCCAGCCAGA	AAAGTGAGGGG	CCCACGGTTG	ATGAGAGCTT
250	260	270	280	290	300
TGTTGTAAGT	GGACCACTTC	GIGATTITGA	ACTTTGCCT	TGCCCCGGAA	CGGTCTGGCT
310	320	330	340	350	360
TGTCGGGAAAG	ATGCGTGATC	TGATCCTTCA	ACTCACGGAAA	AGTTGGATT	ATTCACACAA
370	380	390	400	410	420
GGCACCTTGT	GTCTCAAAAT	CTCTGATGT	ACATGCAACA	AGATAAAAAT	ATATCATCAT
430	440	450	460	470	480
GAACAAATAAA	ACPTGTCTCT	TACATAAAC	GTAAATACAG	GGGTGTTAAG	AGCCATATTG
490	500	510	520	530	540
AAACGGGAAAC	GTCPTGGCCTG	AAAGCTTGT	CGTCCCGGGC	GGGTGACCTG	GGCAGGAGCA
550	560	570	580	590	600
<u>TGGGAGGCTT</u>	<u>GATACCCCTCC</u>	<u>TTGACAGCTT</u>	<u>TGACGTGGCC</u>	<u>AGCTCAOGGG</u>	<u>GCATGATGAG</u>
610	620	630	640	650	660
ACGTGCGCC	GTACATTAG	CCCTACATAC	CCCTATATA	ATCAATTGCA	TOCATACATT
670	680	690	700	710	720
<u>TTGATGGGCG</u>	<u>CGACGGGCGCG</u>	<u>AAGCIAAAAT</u>	<u>TACGGCTCTT</u>	<u>CGCTGGCAGAC</u>	<u>CTGGGAGGAG</u>
730	740	750	760	770	780
GGAAACCTC	CCCTCAGGG	ACCGTTGAA	TCTTCCAC	GGGGGGCGGC	TCTAGAGAAA
790	800	810	820	830	840
<u>TATAMAGT</u>	<u>TAGGATTTC</u>	<u>CACAGAGGT</u>	<u>CTCTTCTCAT</u>	<u>ATACCTCTT</u>	<u>TTAAATCTT</u>
850	860	870	880	890	900
GCTAGGATAC	AGTCTTCACA	TCACATGGA	ACATAAACAA	AAATGGTAA	GGAAAAGACT
910	920	930	940	950	960
<u>CACGGTTGAA</u>	<u>GGCCCGGAGT</u>	<u>AAATTCAC</u>	<u>ATGGATGCTG</u>	<u>ATTATATGG</u>	<u>GTATAAAATGG</u>
970	980	990	1000	1010	1020
GCTCCGGATA	ATGTCGGGCA	ATCAGSTGGC	ACAATCTTC	GATTGTATGG	GAAGCCCGAT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CGGCCAGAGT	TCTTTCGTAA	ACATGGCMAA	CGTACGGTTC	CCAATGATGT	TACAGATGAG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
ATGGTCAGAC	TAATCTGGT	GAACGAATT	ATGCTCTTC	CGACCCATCA	GCATTTTATC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CTTACTCTTG	ATGATGCGATG	GTACTCTACC	ACTGGCATCC	CGGGGAAAC	AGCAATTCCAG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CTATTAGAG	ATATATCTGA	TTCAAGGTGA	AAATATTCTTG	ATGGCGTGGC	AGTGTTCCTG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGCCGGTTGC	ATCGATTCC	TCTTGTAAAT	TGCTCTTTA	ACAGGGATCC	CGTATTTCTG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CTGGCTTCAAG	CCCAATCAC	ATGAAATAC	GGTTGGTTC	ATGGGAGTGA	TTTGATGAC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GAGGCTTAATG	GCTGGCTGT	TGAACAGTC	TGGAAAGAAA	TGCATAAGCT	TTTGCATTC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
TCACCGGATT	CAGTCGTCAC	TCACTGGTAT	TTCTCACCTG	ATACCTTAT	TTTGACGAG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GGGAATTA	TAGGTGTAT	TGATGTGGA	CGAGTCGGAA	TCGGIAGACCC	ATIACCGAGAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTGCGCATCC	TAATGAACTG	CTCGCGTGAG	TTTCCTCTT	CATACAGAA	ACGGCTTTT

Nr. 3 (Fortsetzung)

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CAAAAATATG GTATTGATAA TCCGTGATATG AATAAAATTGGC AGTTTCATT GATGCTCGAT
1690 1700 1710 1720 1730 1740
GAGTTTTTCTT ATTCAGAATT GGTTAAATTGG TTGTAACACTT GGCAGAGCAT TACCGTGACT
1750 1760 1770 1780 1790 1800
TGACCGGGACG GGGGCTTTGT TGAATTAATTC GAACTTTTGC TGAGTTGAAG GATCAGATCA
1810 1820 1830 1840 1850 1860
CCCACCTTCC OGACAAAGCA GACCGTTCCG TGGCAAAGCA AAAGTTCAAAT ATCACCAACT
1870 1880 1890 1900 1910 1920
GGTCCACCTA CAACAAAGCT CTCACTCAACC GTGGCTCCCT CACITTCCTG CTGGATGATG
1930 1940 1950 1960 1970 1980
GGGGGATTCA GGGCTGGTAT GAGTCAGCA CACCTTCTTC ACGAGGGAGA CCTCAGGGCT
1990 2000 2010 2020 2030 2040
ATTCCTGACCT TGGCCATCAAG ACTTGAGCTGG TCATTAAACG CGTATTCAAGG CTGACCCCTGC
2050 2060 2070 2080 2090 2100
GGGCTGGCA GGCCTTTAAT GATTCATT TTACACTGAT GAATGTCGG TTGGCGCTGCC
2110
CGGATTACAG TOGAC 3'

Legenden zu den Figuren 1 bis 8

Fig. 1: Plasmid pAG-1. ARS: *S.cerevisiae* ARS1 Sequenz; 2 micron: EcoRI Fragment des *S.cerevisiae* 2 μ Plasmids mit Replikationsursprung; URA3: *S.cerevisiae* URA3 Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenz; geschlossener Pfeil: *S.cerevisiae* cycl-13 Promoter; Schwarze Box: *S.cerevisiae* CYC1 Terminator; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

10 Fig. 2: Plasmid pAG-2. amp: Ampicillinresistenz; 2 micron: EcoRI Fragment des *S.cerevisiae* 2 μ Plasmids mit Replikationsursprung; URA3: *S.cerevisiae* URA3 Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenz; ORI: Ursprung der Plasmidreplikation in *E.coli*; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

15 Fig. 3: Plasmid pAG-100. amp: Ampicillinresistenz; 2 micron: EcoRI Fragment des *S.cerevisiae* 2 μ Plasmids mit Replikationsursprung; URA3: *S.cerevisiae* URA3 Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenz; ORI: Ursprung der Plasmidreplikation in *E.coli*; geschlossener Pfeil: *A.gossypii* DNA Fragment mit TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

20 Fig. 4: Plasmid pAG-5. amp: Ampicillinresistenz; G418r: (Kanamycin)resistenz; ORI: Ursprung der Plasmidreplikation in *E.coli*; TEF: *A.gossypii* EcoRI/BamHI Fragment mit ORF für den Translationselongationsfaktor; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

25 Fig. 5: Plasmid pAG-101. amp: Ampicillinresistenz; G418r: G418 (Kanamycin)resistenz; ORI: Ursprung der Plasmidreplikation in *E.coli*; TEF: *A.gossypii* EcoRI/BamHI Fragment mit ORF für den Translationselongationsfaktor; geschlossener Pfeil: *A.gossypii* DNA Fragment mit TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

30 Fig. 6: Plasmid pPL1. amp: Ampicillinresistenzgen; M13+: Replikationsursprung für Einzelstrang-DNA-Isolierung; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in *E.coli*; lacZ: *E. coli* lacZ Gen; Prom: 1500 bp *A.gossypii* DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion .

Fig. 7: Plasmid pAG-110. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; Prom: 1500 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; geschlossener Pfeil: 1500 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

10 Fig. 8: Plasmid pAG-111. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; Prom: 403 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; geschlossener Pfeil: A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

15 Fig. 9: Plasmid pPL2. amp: Ampicillinresistenzgen; M13+: Replikations-20 ursprung für Einzelstrang-DNA-Isolierung; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; lacZ: E. coli lacZ Gen; Prom: 294 bp A.gossypii DNA Fragment mit einem Teil der TEF-Promotorregion (270 bp).

25 Fig. 10: Plasmid pPL3. amp: Ampicillinresistenzgen; M13+: Replikations-ursprung für Einzelstrang-DNA-Isolierung; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; lacZ: E. coli lacZ Gen; Prom: 239 bp A.gossypii DNA Fragment mit einem Teil der TEF-Promotorregion (215 bp).

30 Fig. 11: Plasmid pPL4. amp: Ampicillinresistenzgen; M13+: Replikations-ursprung für Einzelstrang-DNA-Isolierung; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; lacZ: E. coli lacZ Gen; Prom: 158 bp A.gossypii DNA Fragment mit einem Teil der TEF-Promotorregion (134 bp).

35 Fig. 12: Plasmid pAG-112. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; Prom: 294 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; geschlossener Pfeil: A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

Fig. 13: Plasmid pAG-113. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; Prom: 239 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; geschlossener Pfeil: A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

10 Fig. 14: Plasmid pAG-114. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; Prom: 158 bp A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; geschlossener Pfeil: A.gossypii DNA Fragment mit der TEF-Promotorregion; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

15 Fig. 15: Plasmid pAG-115. 2 μ : EcoRI Fragment des S.cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung; URA3: S.cerevisiae URA3 Gen; lacZ: E.coli lacZ Gen; G418r: G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprung für Plasmidreplikation in E.coli ; amp: Ampicillin-resistenzgen; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

20 Fig. 16: TEF-Promotorfragmente der β -Galactosidase-Expressionsplasmide.

Fig. 17: Nukleotidsequenz im ATG-Bereich und im Terminatorbereich von M13PT1, M13PT2, M13PT3, pAG-201, pAG-202, pAG-203.

25 Fig. 18: Plasmid pAG-201, pAG-202, pAG-203. 2 μ : ECORI Fragment des S. cerevisiae 2 μ Plasmides mit Replikationsursprung: Prom, Term: 751 bp A. gossypii DNA-Fragment mit der TEF-Promotor-Terminator-Fusion. G418r:G418 (Kanamycin)resistenzgen; ori: Ursprungspunkt der Plasmidreplikation in E. coli; amp: Ampicillinresistenzgen; offene Pfeile stellen die Transkriptionsrichtung dar.

30 Fig. 19: Nukleotidsequenz von der Fusion aus Promotor und Terminator des TEF-Gens.

40

Patentansprüche

1. Promotorregion des A.gossypii-Gens, welches den Translationselongationsfaktor EF-1 α kodiert.

5 2. Pilze, die mit der Promotorregion gemäß Anspruch 1 genetisch verändert wurden.

3. Verwendung von Pilzen gemäß Anspruch 2 zur Herstellung von Proteinen.

10 4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Pilz A.gossypii ist.

15 5. Verwendung von Pilzen gemäß Anspruch 2 zur Überexpression von Genen der Vitamin B2-Biosynthese oder von Genen, die mit der Überproduktion von Vitamin B2 in Zusammenhang stehen.

20 6. Verwendung von Pilzen gemäß Anspruch 4 zur Überexpression von Genen der Vitamin B2-Biosynthese oder von Genen, die mit der Überproduktion von Vitamin B2 in Zusammenhang stehen.

25 7. Terminatorregion des A. gossypii-Gens, welches den Translationselongationsfaktor EF-1 α kodiert.

25

30

35

40

1/19

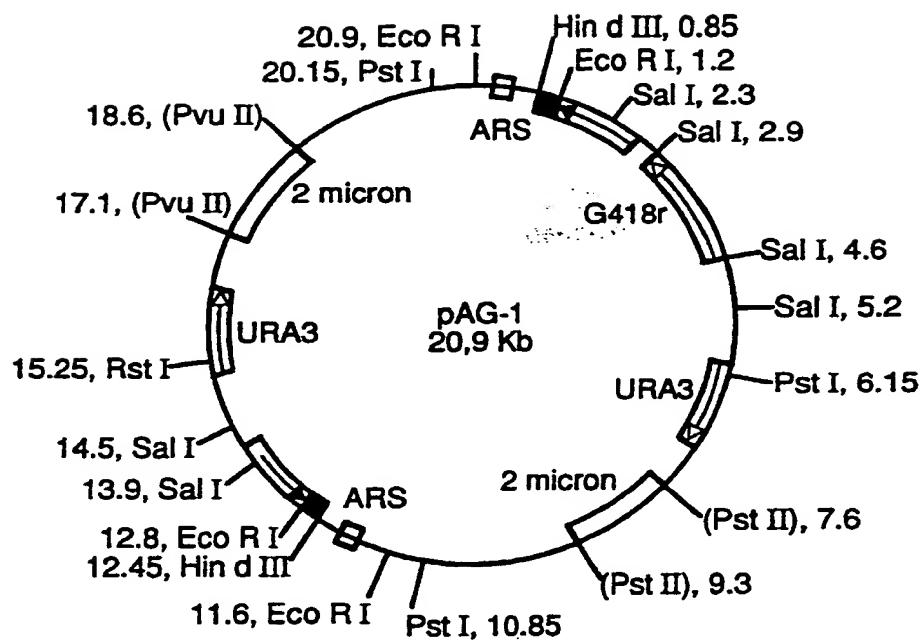


FIG. 1

2/19

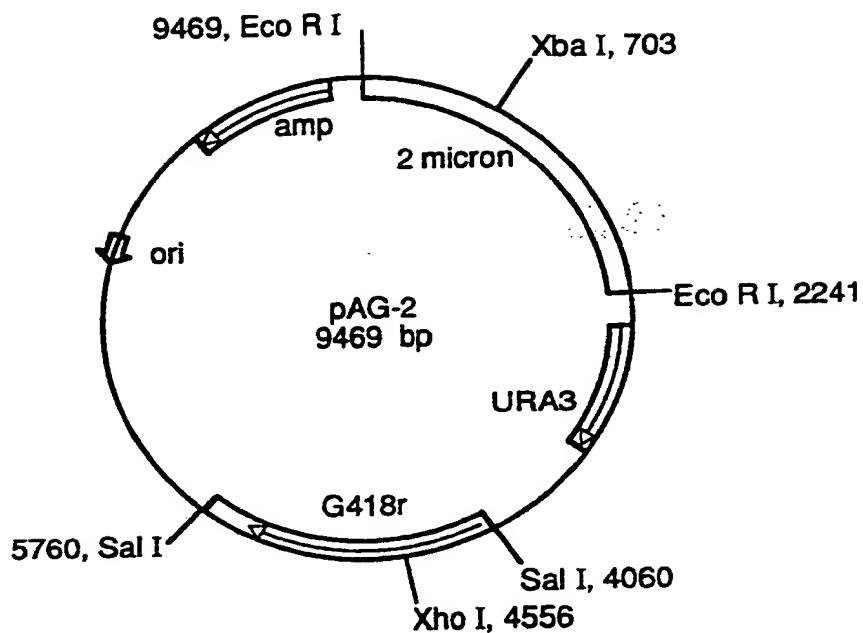


FIG. 2

3/19

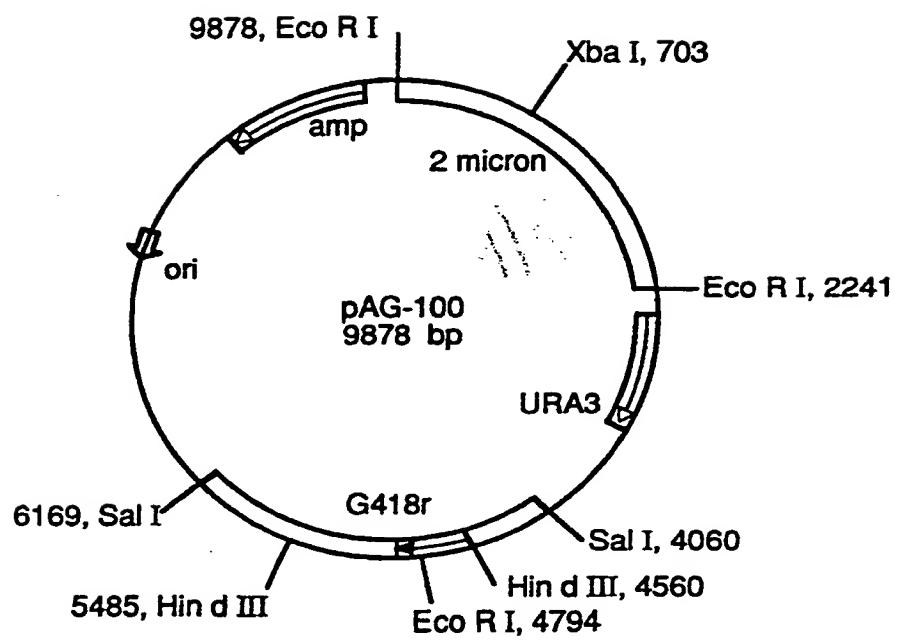


FIG. 3

4/19

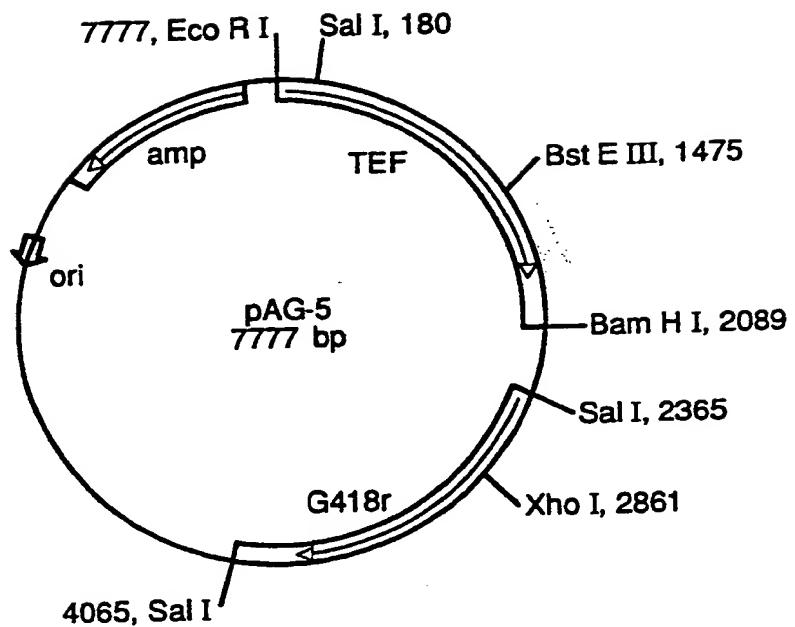


FIG. 4

5/19

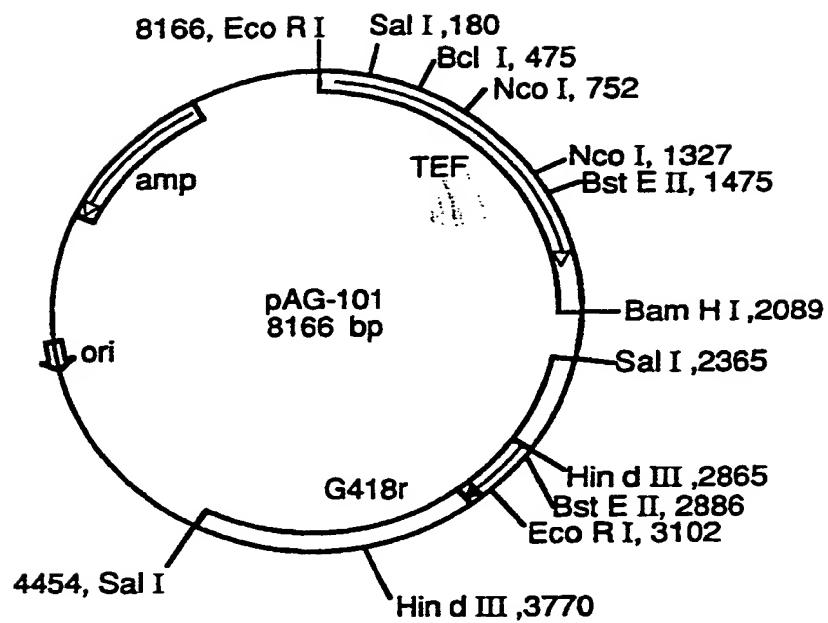


FIG. 5

6/19

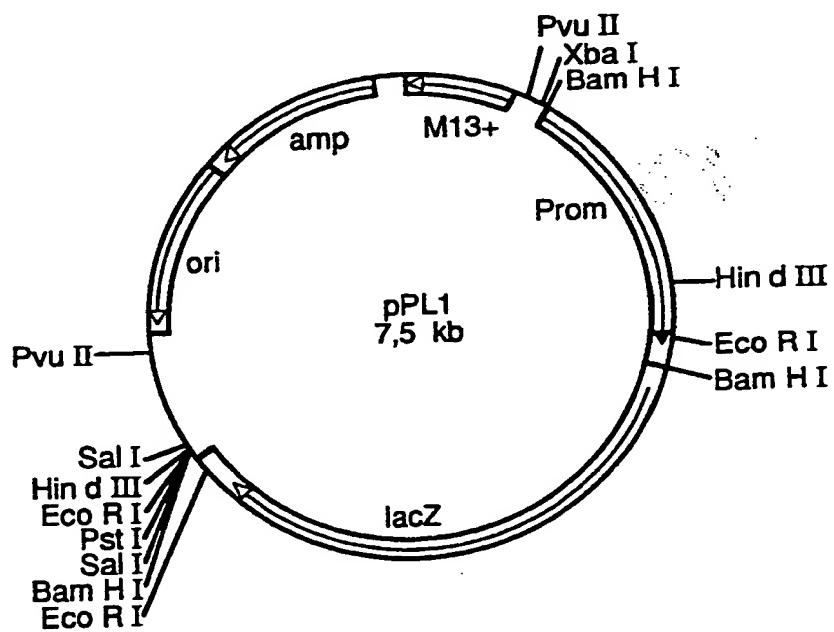


FIG. 6

7/19

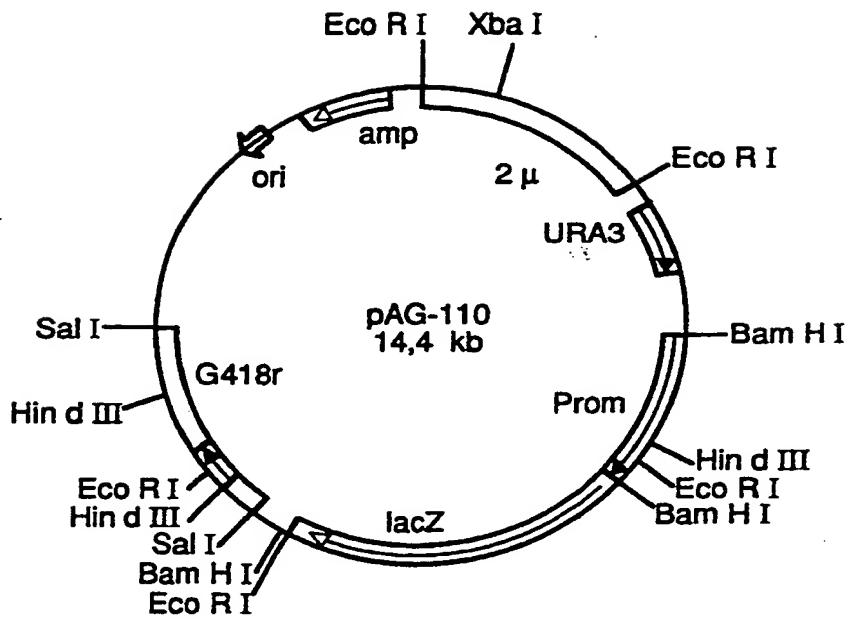


FIG. 7

8/19

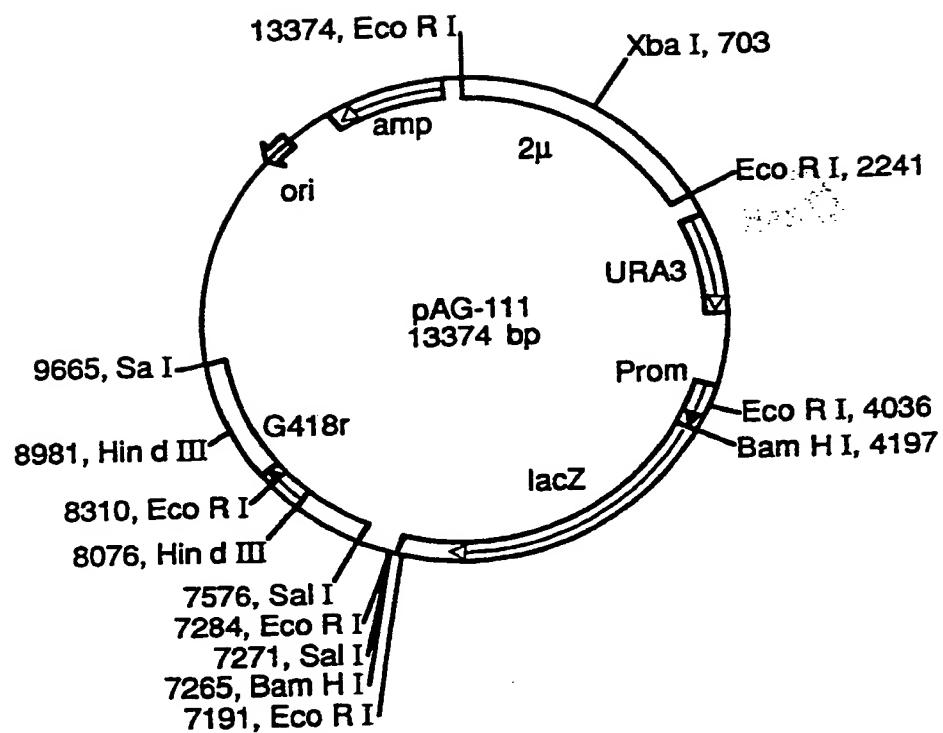


FIG. 8

9/19

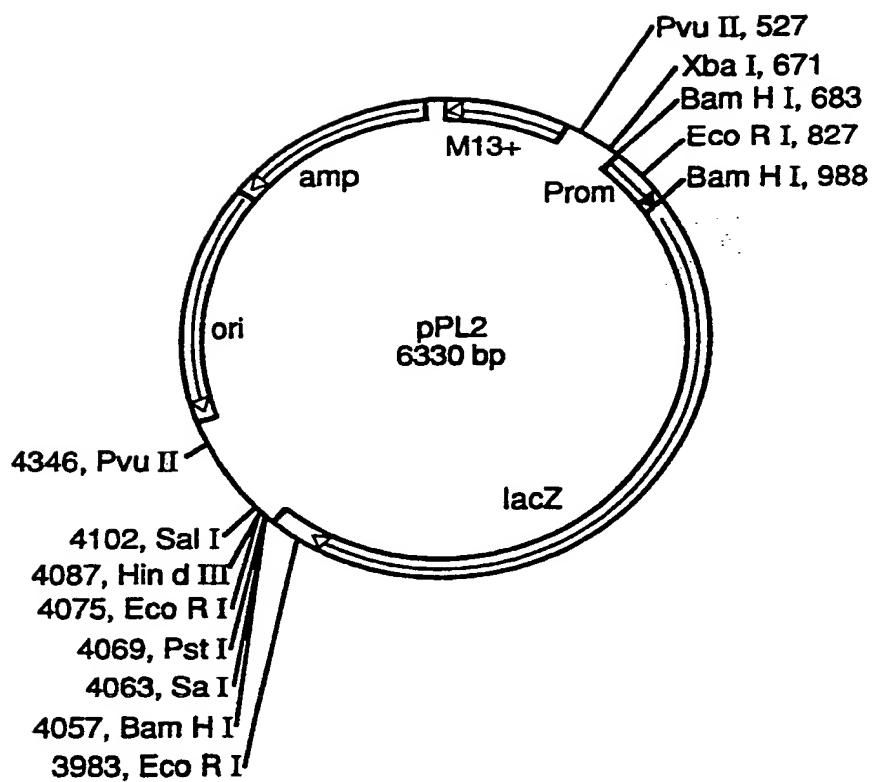


FIG. 9

10/19

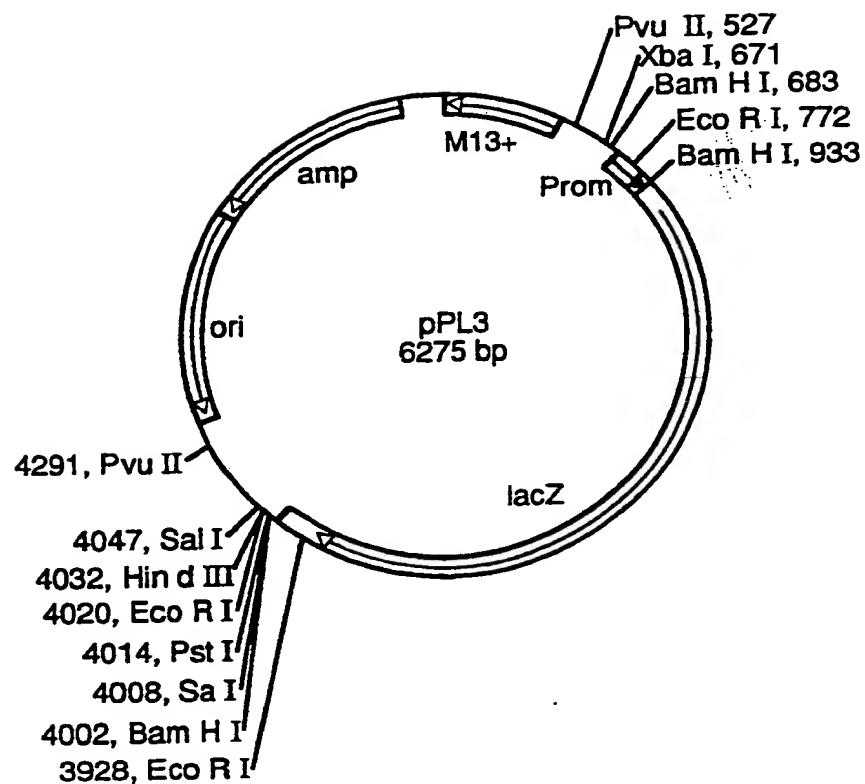


FIG. 10

11/19

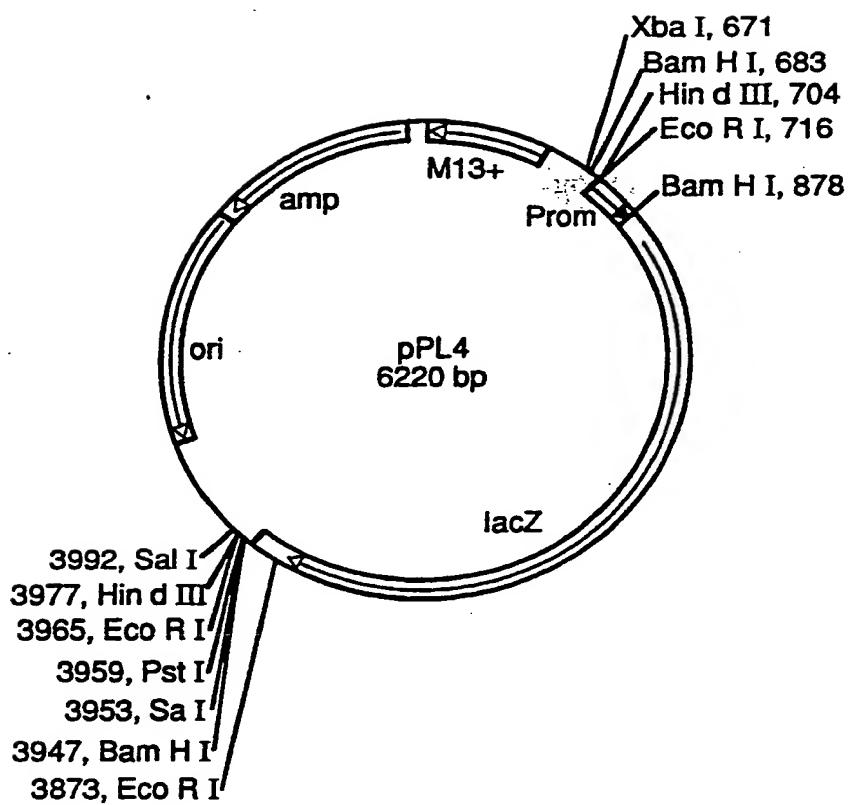


FIG. 11

12/19

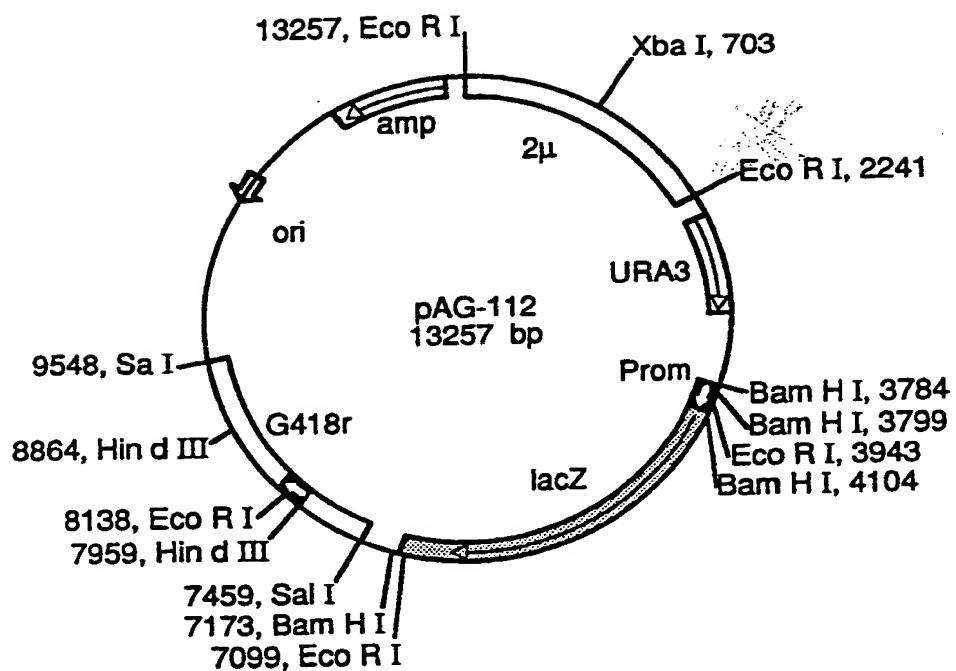


FIG. 12

13/19

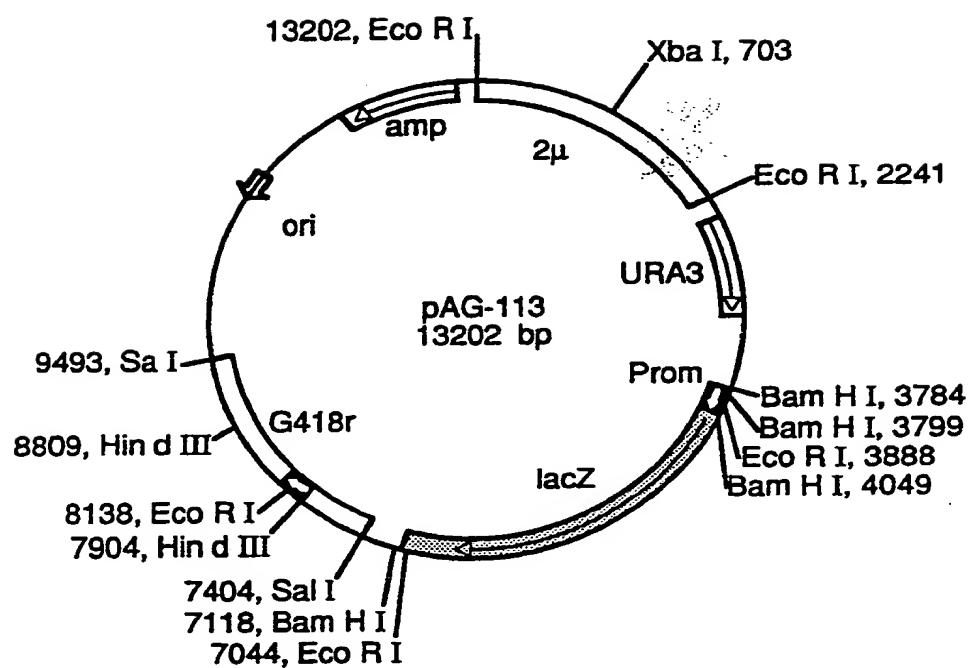


FIG. 13

14/19

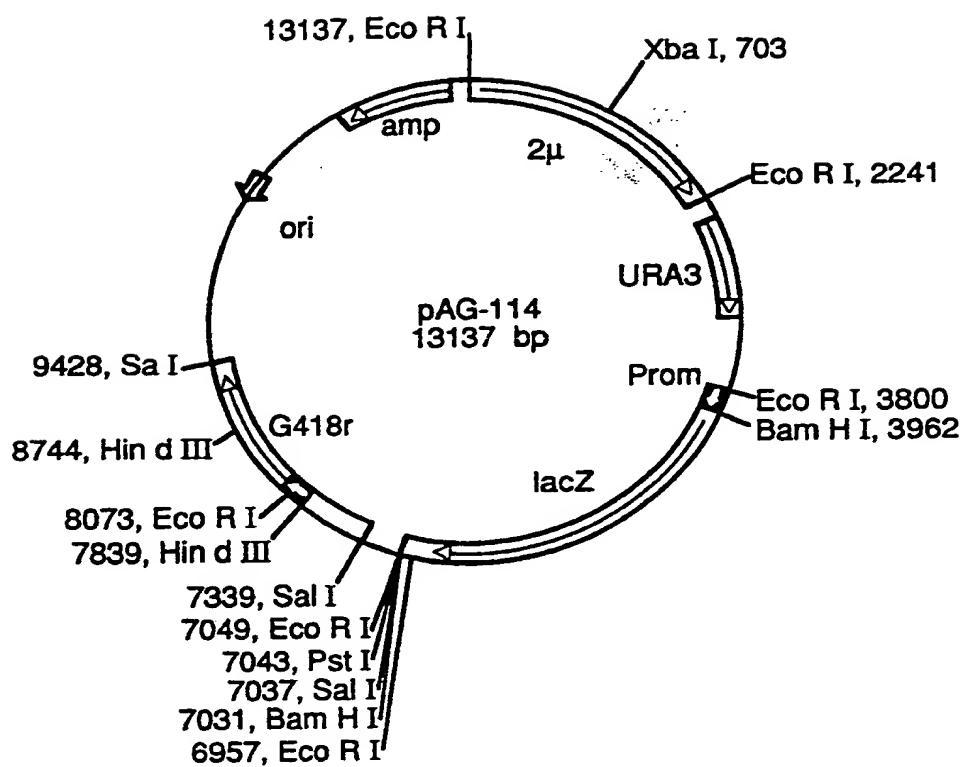


FIG. 14

15/19

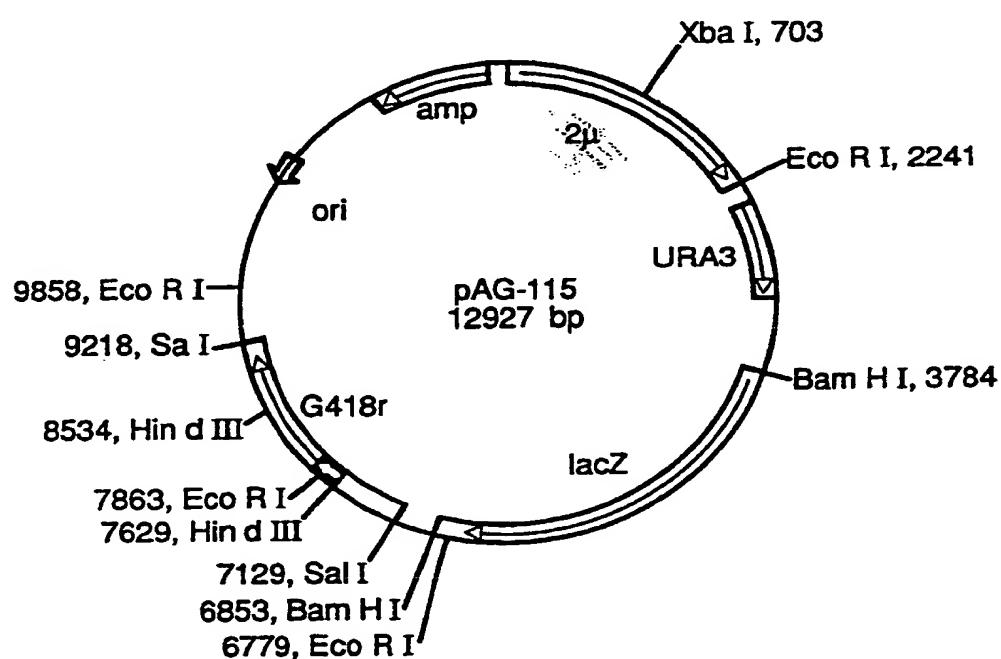


FIG. 15

16/19

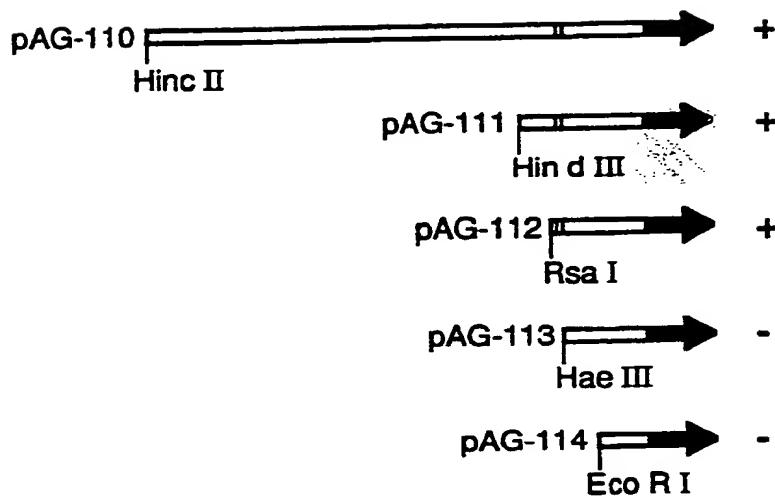


FIG. 16

17/19

Figur 17: Mutationen im ATG-Bereich

Wildtyp	CGAACATAACAAAAATGGGTAAAGGAAAAG GCTTGTTTGTTCACCCATTCCCTTTC
NcoI-Schnittstelle	CGAACATAAC <u>AACC</u> ATGGGTAAAGGAAAAG GCTTGTTTGT <u>GGT</u> ACCCATTCCCTTTC
NsiI-Schnittstelle	CGAACATAAC <u>AAA</u> AT <u>GC</u> CATAAGGAAAAG GCTTGTTTGT <u>TTAC</u> GTATTCCCTTTC
SphI-Schnittstelle	CGAACATAAC <u>AAGC</u> AT <u>GC</u> GTAAAGGAAAAG GCTTGTTTGT <u>TACG</u> CATTCCCTTTC

Durch Substitution der Wildtyp-Sequenz durch die unterstrichenen Nukleotide wurden neue Schnittstellen im ATG-Bereich eingeführt.

Mutationen im Terminatorbereich:

Wildtyp	GGCTGGTAAGAAATAGAGTA <u>ACTGACAAT</u> CCGACCATTCTTATCTCATT <u>GACTGTTA</u>
ScaI-Schnittstelle	GGCTGGTAAGAAATAGAGT <u>ACTGACAAT</u> CCGACCATTCTTAT <u>CTCA TGACTGTTA</u>

Durch Deletion eines A/T-Basenpaars wurde im Terminatorbereich eine ScaI-Schnittstelle eingeführt.

18/19

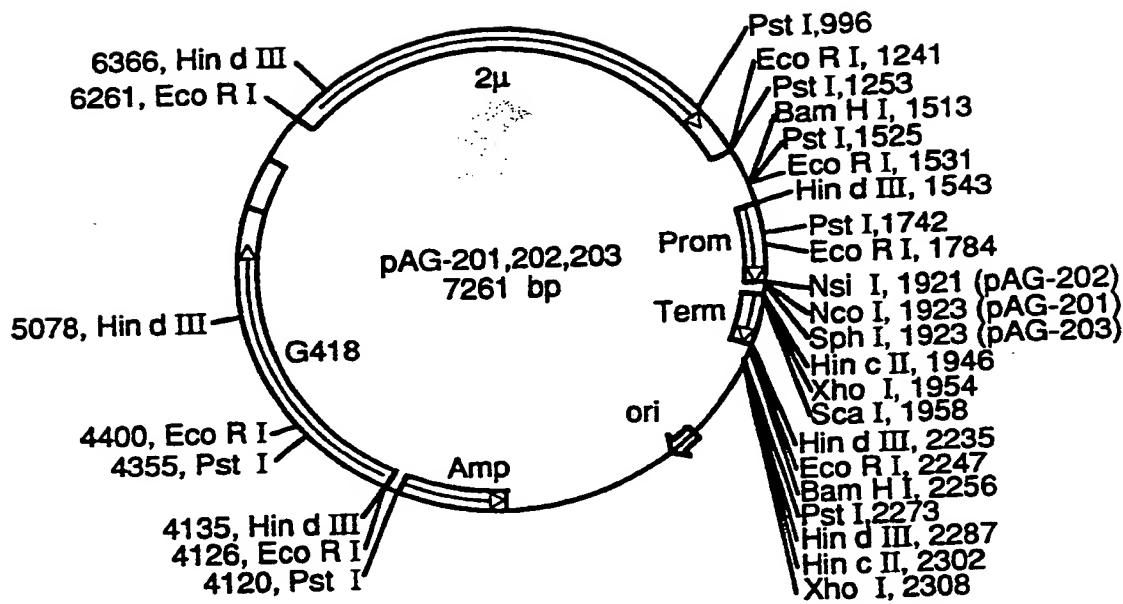


FIG. 18

19/19

Figur 19

Fusion aus TEF-Promotor- und TEF-Terminatorfragment

AAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGCGGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCC

HindIII

CAGATAACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCACGGGCATGATGT

GACTGTCGCCGTACATTAGCCCATACTCCCCATGTATAATCATTGCA

TCCATACATTTGATGGCCGCGACGGCGCGAAGCAAAATTACGGCTCCTC

GCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCTCAGCAGACGCGTTGAATT
ECORICTCCCCACGGCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCAC

TGAGGTTCTTCTTCATATACTTCCTTTAAAATCTTGCTAGGATACAGTT

Start

CTCACATCACATCCGAACATAAACAAAAATGGTAAGGAAAGACTCACGT
HincII

Stop

TGACCTGGAGGTCCGCCAAAAGGCTGGTAAGAAATAGAGTACTGACAA

XbaI

ScaI

AAAAAGATTCTGTTTCAAGAACTTGTCAATTGTATAGTTTTTATAT

TGTAGTTGTTCTATTTAATCAATGTTAGCGTGATTATATTTTTTGC

CTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGAAAGTAATATCA

TGCCTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTACTGCTGCGATTCGATAC,

TAACGCCGCCATCCAGTGTCT

Sequenz von Promotor- und Terminatorregion des TEF-Gens. Das Startcodon und das Stopcodon des TEF-Gens sind mit Start und Stop bezeichnet. Die Schnittstellen beziehen sich auf die Plasmide pAG-201, pAG-202, pAG-203 (Fig. 18).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01116

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC
 Int.Cl. ⁵ C 12 N 15/80; C 12 P 25/00; C 12 N 1/14; C 12 N 1/14

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	C 12 N; C 07 K; C 12 P

Documentation Searched other than Minimum Documentation
 to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category ⁹	Citation of Document, ¹⁰ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, X	YEAST volume 6, 31 July 1990, CHICHESTER, U.K. page 244; S. STEINER ET. AL.: "THE GENE FOR THE TRANSLATION ELONGATION FACTOR EF-1ALPHA OF THE FILAMENTOUS YEAST ASHBYA GOSSYPII AND THE USE OF ITS PROMOTOR IN TRANSFORMATION EXPERIMENTS" see the whole document	1-4
A	CHEMICAL ABSTRACTS, volume 78, No 15, 16 April 1973, Columbus, Ohio, US; abstract No 96073K, T. SZCZESNIAK ET AL. "BIOSYNTHESIS OF RIBOFLAVINE" page 350; see abstract	

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

Date of Mailing of this International Search Report

2 September 1991 (02.09.91)

11 September 1991 (11.09.91)

International Searching Authority

Signature of Authorized Officer

EUROPEAN PATENT OFFICE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 91/01116

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC
 Int.K1. 5 C12N15/80 ; C12P25/00 ; C12N1/14 ; C12N1/14;

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationsymbole		
Int.K1. 5	C12N ;	C07K ;	C12P

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
P, X	<p>YEAST Bd. 6, 31. Juli 1990, CHICHESTER, U.K. Seite 244; S. STEINER ET. AL.: 'THE GENE FOR THE TRANSLATION ELONGATION FACTOR EF-1ALPHA OF THE FILAMENTOUS YEAST ASHYA GOSSYPII AND THE USE OF ITS PROMOTOR IN TRANSFORMATION EXPERIMENTS' siehe das ganze Dokument</p> <p>—</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 78, no. 15, 16. April 1973, Columbus, Ohio, US; abstract no. 96073K, T. SZCZESNIAK ET AL. 'BIOSYNTHESIS OF RIBOFLAVINE' Seite 350; siehe Zusammenfassung</p> <p>—</p>	1-4
A		

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderer bedeutsam angesehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Bewertung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfandenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfandenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

02. SEPTEMBER 1991

Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts

11. 09. 91

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

THIELE U.H.C.H.

